

PCT/KR 2004/002888
RO/KR 09.11.2004.



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0079482
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 11월 11일
Date of Application NOV 11, 2003

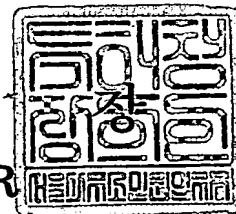
출원 인 : 국립암센터
Applicant(s) NATIONAL CANCER CENTER



2004 년 02 월 03 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.11
【발명의 명칭】	HGF의 중화가능 에피토프 및 이에 결합하는 중화 항체
【발명의 영문명칭】	NEUTRALIZABLE EPITOPE OF HGF AND NEUTRALIZING ANTIBODY BINDING TO SAME
【출원인】	
【명칭】	국립암센터
【출원인코드】	1-2000-036786-6
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-073246-6
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-073244-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정준호
【성명의 영문표기】	CHUNG, Junho
【주민등록번호】	631123-1480217
【우편번호】	110-034
【주소】	서울특별시 종로구 창성동 98-2 501호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	허영미
【성명의 영문표기】	HUR, Youngmi
【주민등록번호】	710913-2849718
【우편번호】	140-212
【주소】	서울특별시 용산구 한남2동 683-34 번지 B02호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】** 35**【서열목록의 전자파일】** 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이현실 (인) 대리인
장성구 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 28 면 28,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 7 항 333,000 원**【합계】** 390,000 원**【감면사유】** 정부출연연구기관**【감면후 수수료】** 195,000 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 HGF(hepatocyte growth factor; 간세포성장인자)와 그 수용체간의 결합을 방해하는 HGF의 신규 중화가능 에피토프 및 상기 에피토프에 결합하여 단일 제제로서 HGF를 중화시킬 수 있는 중화 항체에 관한 것으로서, 서열번호 32 또는 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HGF의 중화가능 에피토프 및 상기 에피토프에 결합하여 단일 제제로서 HGF를 중화시킬 수 있는 중화 항체를 제공한다. 본 발명에 따른 중화 항체는 단일제제로서 HGF를 중화시킬 수 있으므로, 보다 효과적으로 HGF와 그 수용체인 Met의 결합에 의해 야기되는 여러 가지 질환, 특히, 암의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 9

【색인어】

HGF, SF, 에피토프, 중화 항체

【명세서】

【발명의 명칭】

HGF의 중화가능 에피토프 및 이에 결합하는 중화 항체{NEUTRALIZABLE EPITOPE OF HGF AND NEUTRALIZING ANTIBODY BINDING TO SAME}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 HGF의 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 항체 라이브러리 제조에 사용된 파지미드 벡터 pComb3X의 개략적인 유전자 구성을 도식화한 것으로, 파지 표면에 Fab를 표면발현(display)하는 것과(A), scFv 또는 diabody를 표면발현하는 것(B)을 나타낸 것이다.

도 3은 패닝을 통한 HGF 결합 클론의 배양시 HGF에 특이적으로 결합하는 Fab를 표면발현하는 파지 분획이 증가하는 것을 나타낸 것이다.

도 4는 정제된 Fab 절편에 대해 쿠마시 염색을 수행한 겔사진이다.

1 : 마커,

2 : 비환원된 클론 68 항체(50,000Da),

3 : 환원된 클론 68 항체(25,000Da)

도 5는 정제된 Fab 절편의 발현 여부를 웨스턴 블롯으로 확인한 겔사진이다.

도 6은 본 발명에 따른 중화가능 에피토프를 함유한 파지가 c-MET에 결합하는 정도를 나타낸 그래프이다.

1 : 서열번호 32의 펩타이드를 함유하는 파지

2 : 서열번호 33의 펩타이드를 함유하는 파지

3, 4 : 서열번호 32 및 33의 펩타이드를 함유하지 않은 대조군 파지

도 7은 클론 H61과 H68 Fab의 HGF에 대한 특이적 결합을 나타낸 것이다.

도 8은 클론 H61과 클론 H68에서 중화능 에피토프의 형태 의존성(conformation dependency)을 나타낸 것이다.

A : 클론 61, B : 클론 68

레인 1 : 환원되지 않은 HGF를 로딩

레인 2 : 환원된 HGF를 로딩

도 9는 세포의 비산 정도를 1등급부터 6등급까지 나눈 기준과(B), 첨가한 항 HGF Fab와 항 human Fab 항체의 HGF 농도에 따라 비산 정도가 달라지는 것을 보여주는 그림(A)이다.

도 10은 클론 68 항체의 주입량이 증가함에 따라 CM5 칩에 고정되어있는 HGF에 결합하는 클론 68 항체의 양이 증가하는 것을 보여주는 그래프이다.

I : Non-specific Fab 주입, II : 50nM 클론 68 항체 주입

III : 100nM 클론 68 항체 주입, IV : 200nM 클론 68 항체 주입

V : 400nM 클론 68 항체 주입, VI : 600nM 클론 68 항체 주입

도 11은 클론 68 항체의 c-Met에 대한 HGF의 결합억제 정도를 나타낸 그래프이다.

I : 50nM HGF를 주입,

II : 50nM HGF에 50nM 클론 68 항체를 혼합하여 주입

III: 50nM HGF에 250nM 클론 68 항체를 혼합하여 주입

IV: 50nM HGF에 500nM 클론 68 항체를 혼합하여 주입

V: 50nM HGF에 1 μ M 클론 68 항체를 혼합하여 주입

VI: 50nM HGF에 1.5 μ M 클론 68 항체를 혼합하여 주입

도 12는 수용성 c-Met에 의한 HGF의 c-Met에 대한 결합억제 정도를 나타낸 그래프이다.

I: 50nM HGF를 주입

II: 50nM HGF에 50nM 수용성 c-Met을 혼합하여 주입

III: 50nM HGF에 100nM 수용성 c-Met을 혼합하여 주입

IV: 50nM HGF에 200nM 수용성 c-Met을 혼합하여 주입

V: 50nM HGF에 400nM 수용성 c-Met을 혼합하여 주입

VI: 50nM HGF에 600nM 수용성 c-Met을 혼합하여 주입

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<37> 본 발명은 HGF의 신규 중화가능 에피토프 및 이에 결합하는 중화 항체에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 HGF와 그 수용체간의 결합을 방해하는 HGF의 신규 중화가능 에피토프 및 상기 에피토프에 결합하여 단일 제제로서 HGF를 중화시킬 수 있는 중화 항체에 관한 것이다.

<38> HGF(hepatocyte growth factor; 간세포성장인자)는 SF(scatter factor; 산란인자)라고도 하며, 간엽간세포(mesenchymal cell)에 의해 생산되는 다기능성 이종이중체(heterodimer) 폴리펩타이드이다.



- <39> HGF는 도 1에 도시되어 있는 바와 같이, N-말단 도메인과 세린 프로테아제와 같은 베타-체인 C-말단 도메인에 공유결합으로 연결된 4개의 크링글 도메인(NK4)을 포함하는 알파-체인으로 이루어져 있다. 인간 HGF는 생물학적으로 비활성인 단일 체인 형태의, 728개의 아미노산을 갖는 전구체로 합성되고, R494 잔기가 특이적 혈청 세린 프로테아제에 의해 절단되어 생물학적으로 활성인 HGF가 된다. 활성 HGF는 69kDa의 알파-체인과 34kDa의 베타-체인이 이황화 결합으로 연결된 이종이중체이다. 그러나, 아직까지 HGF의 전체 3차원 구조는 알려져 있지 않은 상태이고, HGF의 기능도 이들 도메인에 대해 명확하게 알려져 있지 않다(Maulik et al., Cytokine & Growth Factor Reviews. Vol.13(1), p41-59, 2002).
- <40> HGF가 그 수용체인 Met에 결합하면 다양한 세포 유형의 성장 및 분화를 유발하고, 상피 간엽 전이 및 세관(tubule)과 내강(lumen)의 형성을 매개하며, 혈관신생을 촉진한다. Met와 HGF가 모두 녹아웃(knock-out)된 쥐는 배아 단계에서 사망률이 높고, 태반, 태아 간 및 팔다리/근육 형성에 있어 분화의 결함을 나타낸다(Cao et al., PNAS, vol.98(13), p7443-7448, 2001; Gmyrek et al., American Journal of Pathology, p579-90, vol.159(2), 2001).
- <41> 원래 Met는 항상적 활성을 갖는(constitutively active) 변형된 단백질 인산화효소를 코딩하는, 인간 원암 유전자 trp-met의 유전자 산물로 분리되었다. Met 활성화는 또한 혈관신생, 세포 운동성 및 세포 표면 단백질 분해효소 조절과 같은 과정에 자극적인 영향을 미치는 것으로부터 시작하여 암의 전이를 현저히 증가시키는 것으로 알려져 왔다(Wielenga et al., American Journal of Pathology, Vol.157(5), p1563-73, 2000). Met는 간, 전립선, 대장, 유방, 뇌 및 피부를 포함하는 다양한 인간 암에서 과량 발현되는 것으로 보고되었다(Maulik et al, supra). 따라서, Met는 암을 예방 및 치료하기 위한 표적 인자로서 관심의 대상이 되어 왔다.

<42> 한편, 암 관련 성장 인자 또는 사이토카인과 그들의 수용체의 선택적 중화는 암의 발전 및 전이에 중요한 역할을 수행하기 때문에, 항암제 개발을 위한 매력적인 전략으로 인식되어 왔다. 최근, 허르셉틴(herceptin)과 같은 수많은 치료용 단일클론항체 및 항-혈관신생인자 인간 단일클론항체가 조합 항체 라이브러리(combinatorial antibody library)의 파지 표면발현과 같은 재조합 항체 기술을 이용하여 개발되어 왔다.

<43> HGF에 대한 다클론항체가 다수의 생물학적 기능을 억제한다는 것이 잘 알려져 있다. 또한, 최근에는 HGF에 대한 중화 단일클론항체의 혼합물이 동물 모델에서 항암활성을 보인다는 연구 결과가 카오 등에 의해 보고된 바 있다(Cao et al., PNAS, Vol.98, No.13, 7443-7448 (2001)). 구체적으로, 카오 등은 3개 또는 그 이상의 에피토프, 가능하게는 Met 수용체에 대해 2개, 그리고 헤파린에 대해 1개가 in vitro 및 in vivo에서 HGF 활성을 억제하는데 요구된다는 것과, 실험적으로도 적어도 3개의 마우스 단일클론항체의 혼합물이 HGF를 중화시킬 수 있었다는 것을 개시하고 있다.

<44> 하지만, 지금까지 단일 제제로서 HGF를 중화하여 in vitro에서 세포 비산 활성(cell scattering activity)를 저해하는 것으로 보고된 단일클론항체는 제조된 바 없었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<45> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 HGF와 그 수용체간의 결합을 방해하는 HGF의 신규 중화가능 에피토프를 제공하는 것이다.

- <46> 본 발명의 다른 목적은 상기 중화가능 에피토프에 결합하여 단일 제제로서 HGF를 중화시킬 수 있는 중화 항체를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <47> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 32 또는 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HGF의 중화가능 에피토프를 제공한다.
- <48> 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 중화가능 에피토프에 결합하는 중화 항체를 제공한다.
- <49> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <50> 본 발명은 서열번호 32 또는 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HGF의 신규 중화가능 에피토프를 제공한다는 데에 특징이 있다.
- <51> 본 발명에 따른 HGF의 중화가능 에피토프를 제조하기 위하여, 먼저, HGF를 주입한 토끼의 항혈청과 재조합 인간 HGF와의 결합여부를 ELISA를 통하여 분석하여 면역 토끼의 항혈청이 HGF에 특이적으로 결합함을 확인한 후, 면역 토끼의 전체 RNA를 분리하여 cDNA를 합성한다.
- <52> 토끼의 $V_L(V_K, V_\lambda)$ 및 V_H 의 항체 가변 영역(Variable region)과 인간의 C_K 및 C_{H1} 항체 불변 영역(Constant region)을 증폭하기 위하여 서열번호 1 내지 20의 프라이머 조합을 이용하여 PCR 반응을 수행한다. 이후, 상기 PCR 반응을 통해 나온 산물을 이용하여 토끼/인간 키메라 항체의 경쇄와 중쇄를 증폭하고, 증폭된 토끼 V_L 및 V_H 서열을 인간 C_K 및 C_{H1} 서열과 결합시켜 항체 절편(Fab)의 라이브러리를 코딩하는 최종 PCR 절편들을 벡터에 삽입한 후, 상기

벡터로 대장균을 형질전환시킴으로써 키메릭 토끼/인간 Fab 라이브러리를 제조한다. 상기 벡터와 대장균은 당업계에서 통상적으로 사용되는 것이면 제한없이 사용될 수 있으나, 벡터는 파지미드 벡터 pComb3X(the Scripps Research Institute, CA, USA)를 사용하는 것이 바람직하고, 대장균은 *E. Coli* ER2537(NEB)을 사용하는 것이 바람직하다.

<53> 이후, HGF로 코팅된 ELISA 플레이트 및 항-인간 염소 Fab 다클론 항체를 사용한 EIA를 통해 항 HGF Fab를 포함하는 파지 클론을 선별한다. 본 발명자들은 선별된 항 HGF Fab를 포함하는 파지 클론을 H61(클론 61) 및 H68(클론 68)로 명명하였다.

<54> 상기 H61 및 H68 클론에 대해 염기서열 분석을 수행하고, 결정된 염기서열로부터 아미노산 서열을 결정한다. 본 발명의 일실시예에서는 염기서열 분석을 염료표지 프라이머 시퀀싱 방법(dye labeled primer sequencing method)(Chung et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2002;128:641-649)에 따라 수행하였다. 그 결과, 상기 H61 클론은 각각 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 염기서열을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 갖는다는 것을 확인하였고, H68 클론은 각각 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 염기서열을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 갖는다는 것을 확인하였다.

<55> 이로부터 상기 H61 및 H68 클론의 V_H 및 V_L 영역에 대한 아미노산 서열을 유추해본 결과, H61 클론은 각각 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역 및 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 가지고, H68 클론은 각각 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역 및 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 갖는다는 것을 확인하였다.

- <56> 상기 H61 및 H68 클론의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역(framework region; FR)과 항원결합부위(complementarity determining region; CDR)를 분석해 본 결과, H61 및 H68 클론의 V_H 및 V_L 영역은 각각 4개의 FR과 3개의 CDR이 존재함을 알 수 있었다(표 2 참조).
- <57> HGF의 중화가능 에피토프를 밝혀내기 위하여, 항 HGF 클론 61 혹은 항 HGF 클론 68 Fab로 코팅된 ELISA 플레이트, 펩타이드 라이브러리(phage display of combinatorial peptide library) 및 양고추냉이 퍼옥시다제-결합된 항-M13 파지 염소 단일클론 항체를 사용한 EIA를 통해, 항 HGF 클론 61 혹은 클론 68 Fab에 결합하는 파지 클론을 선별한다. 본 발명에서는 구체적으로 상기 펩타이드 라이브러리로 PHD peptide library™(New England Biolob)를 사용하였다.
- <58> 선별된 파지 클론에 대해 염기서열분석을 수행하고, 결정된 염기서열로부터 아미노산 서열을 결정한다. 분석된 염기서열로부터 유추해 낸 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 32 및 서열번호 33으로 확인되었고, 상기 서열번호 32 및 서열번호 33의 펩타이드가 c-MET에 결합하는 것이 확인되었다(도 6 참조). 이로부터, 항 HGF 항체 클론 61 또는 클론 68의 항원 결합부위는 c-MET의 HGF 결합부위를 모방(mimicking)하고 있고, 항 HGF 항체 클론 61 또는 클론 68에 결합하는 서열번호 32 및 서열번호 33의 펩타이드는 HGF의 c-MET 결합부위를 모방하여 HGF의 중화가능 에피토프로 작용할 수 있음을 알 수 있다.

- <59> 또한, 본 발명은 상기 중화가능 에피토프를 암호화하는 DNA 서열을 제공한다. 구체적으로 상기 DNA 서열은 서열번호 34 및 서열번호 35로 표시되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.
- <60> 나아가, 본 발명은 HGF의 신규 중화가능 에피토프인 서열번호 32 또는 서열번호 33의 펩타이드에 결합하여 중화활성을 나타내는 중화 항체를 제공한다.
- <61> 상기 중화 항체는 키메라 항체, 모노클로날 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.
- <62> 키메라(chimeric) 항체는 항체 가변 영역(variable domain)은 인간 이외의 동물(예를 들면, 마우스, 토끼, 가금류 등)에서 유래하고, 항체 불변 영역(constant domain)은 인간에서 유래한 항체를 의미한다. 이러한 키메라 항체는 당업계에 공지된 유전자 재조합 등의 방법으로 제조될 수 있다.
- <63> 모노클로날 항체(단일클론항체)는 특정 항원에 결합하는 항체를 생산하는 B 세포와 암세포주의 일종인 미엘로마(myeloma) 세포가 융합된 하이브리도마(hybridoma)로부터 생산되는 항체로서, 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다.
- <64> 인간화 항체(humanized antibody)는 동물유래 단일클론항체의 높은 친화도와 특이성은 유지하도록 하고 인체 내에서의 면역유발능을 감소시키기 위하여, 동물유래 단일클론항체의 항원결합부위(Complementarity determining region; CDR)를 인간항체에 이식시켜 제조되는 항체를 의미하며, 항원에 대한 친화도와 인체내에서의 면역유발 정도를 고려하여 인간화시키는 정도를 선택할 수 있다.
- <65> 구체적으로, 본 발명에서는 HGF에 대한 중화 항체로서 토끼/인간 키메라 항체를 제조하였으며, 상기 토끼/인간 키메라 항체는 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역

과 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 갖는 항체이거나, 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역과 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 갖는 항체일 수 있다.

<66> 본 발명의 일실시예에서는 본 발명에 따른 중화 항체가 중화활성을 나타내는지를 MDCK2 비산(scattering) 분석 방법으로 확인하였다(Cao et al., PNAS, Vol.98, No.13, 7443-7448 (2001)). 그 결과, MDCK2 세포에 HGF를 2ng/ml (29 pM)의 농도로 처리하였을 경우, 본 발명에 따른 중화 항체는 항 HGF Fab의 HGF에 대한 몰비(molar ratio)가 50배, 항 human Fab 항체의 HGF에 대한 몰비가 50 - 100배 정도 되었을 때 가장 높은 비산 억제 효과를 볼 수 있었다(도 9 참조). 이는 HGF를 중화하여 MDCK2 세포의 비산 억제를 시키기 위해서는 적어도 3개의 항원 결정 부위를 중화하는 것이 필요하다는 카오 등(Cao et al., supra)의 주장과는 달리, 단 1개의 항원 결정 부위를 중화하는 것만으로도 충분히 HGF를 중화할 수 있다는 것을 최초로 보여주는 것이다. 또한, 이 항원 결정 부위에 결합하는 항체가 반드시 이가(bivalent) 이상이어야만 그 중화 능력이 발휘된다는 것도 증명함으로써 HGF에 이러한 동일 항원 결정부위가 2곳 이상 존재할 가능성도 시사하였다.

<67> 본 발명의 다른 실시예에서는 BIAcore 분석방법을 이용하여 HGF에 대한 항 HGF Fab의 친화도, 클론 68 항체의 c-Met에 대한 HGF의 결합억제능 및 수용성 c-Met에 의한 HGF의 c-Met 결합억제정도를 조사하였다. 그 결과, 클론 68 항체의 주입량이 증가함에 따라 CM5 칩에 고정되어있는 HGF에 결합하는 클론 68 항체의 양이 증가하는 것을 알 수 있고(도 10 참조), 클론 68 항체의 농도를 증가시킴에 따라,

HGF가 c-MET에 결합하는 양이 감소한다는 것을 알 수 있으며(도 11 참조), 수용성 c-MET의 농도를 증가시킴에 따라, HGF가 칩에 고착화한 c-Met에 결합하는 양이 점점 감소한다(도 12 참조)는 것을 알 수 있다.

<68> 이상의 결과로부터, 본 발명에 따른 중화 항체는 단일제제로서 HGF를 중화시킬 수 있음을 알 수 있다.

<69> 이하 본 발명을 실시예를 통해 보다 상세히 설명한다.

<70> 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<71> <실시예 1> HGF 면역 및 cDNA 라이브러리의 제조

<72> 4-5달에 걸쳐, 뉴질랜드 화이트 종의 토끼 2마리에 HGF(R&D systems, USA)를 MPL(Monophosphoryl Lipid A, highly-refined non-toxic Lipid A isolated from remutants of S. minnesota) + TDM(synthetic Trehalose Dicorynomycolate, an analogue of trehalose dimycolate from the cord factor of the tubercle bacillus) + CWS(Cell Wall Skeleton, from deproteinized and delipidated cell walls of mycobacteria) 보조제(Sigma사)에 현탁시켜 3주간격으로 5회 피하주사하였다. 양고추냉이 퍼옥시다제-결합된 항-토끼 Fc 염소 다클론항체(Pierce사)를 이용한 ELISA를 통하여 상기 면역 토끼의 항혈청과 재조합 인간 HGF(R&D systems or Research Diagnostics, Inc.)와의 결합 여부를 분석하였다. 면역전 혈청이 HGF에

거의 결합하지 않는데 반하여, 5회 피하주사가 끝난 후 채취한 혈청은 HGF에 특이적으로 결합함을 알 수 있었다.

- <73> 마지막 주사 후 7일 후에, 면역 토끼의 지라 및 골수를 채취하고 TRI 시약(Molecular Research Center, 미국 신시내티)으로 전체 RNA를 분리한 후, 염화 리튬으로 침전시켰다. 올리고(dT)를 프라이머로 하고 수퍼스크립트 전증폭 시스템(SUPERSCRIPT Preamplification System; Life Technologies, Inc.)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.
- <74> 이후, 레이더 등(Rader C. et al., J. Biol. Chem. 275:13668-13676, 2000)의 방법에 따라 토끼/인간 이중 항체 라이브러리를 제작하였다.

<75> <실시예 2> 토끼의 항체 가변 영역 및 인간의 항체 불변 영역의 증폭

<76> (2-1) 토끼의 항체 가변 영역의 증폭

- <77> 토끼의 $V_L(V_K, V_\lambda)$ 및 V_H 의 항체 가변 영역(Variable region)을 증폭하기 위하여 하기 표 1의 프라이머 조합을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다.

<78>

【표 1】

항목 가변 영역	센스 프라이머 (sense primer)	역방향 프라이머 (reverse primer)
V _K	서열번호 1	서열번호 4
	서열번호 1	서열번호 5
	서열번호 1	서열번호 6
	서열번호 2	서열번호 4
	서열번호 2	서열번호 5
	서열번호 2	서열번호 6
	서열번호 3	서열번호 4
	서열번호 3	서열번호 5
	서열번호 3	서열번호 6
V _L	서열번호 7	서열번호 8
V _H	서열번호 9	서열번호 13
	서열번호 10	서열번호 13
	서열번호 11	서열번호 13
	서열번호 12	서열번호 13

<79> 각 PCR 반응을 위하여 실시예 1에서 합성한 1 μ l cDNA(약 0.5 μ g), 각각 60pmol의 센스 프라이머와 역방향 프라이머, 10 μ l 10 \times PCR buffer, 8 μ l 2.5mM dNTP mixture, 0.5 μ l Taq polymerase를 혼합하고 증류수를 100 μ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초의 반응을 30회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10

분간 정치하였다. 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동을 한 후 Qiaex gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 정제하였다.

80> (2-2) 인간의 항체 불변 영역의 증폭

81> 인간의 항체 불변 영역(Constant region) 중 C κ 영역을 증폭하기 위하여, 20 ng pComb3XTT 벡터(Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1991), 15:88(18), 7978-82), 각각 60pmol의 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 프라이머, 10 μ l 10 \times PCR buffer, 8 μ l 2.5mM dNTP mixture, 0.5 μ l Taq polymerase를 혼합하고 증류수를 100 μ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초의 반응을 20회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 정치하였다.

82> 한편, 인간 C μ 1 영역을 증폭하기 위하여, 20ng pComb3XTT(Barbas et al., supra), 각각 60pmol의 서열번호 16 및 서열번호 17로 표시되는 프라이머, 10 μ l 10 \times PCR buffer, 8 μ l 2.5mM dNTP mixture, 0.5 μ l Taq polymerase를 혼합하고 증류수를 100 μ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초의 반응을 20회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하였다.

83> 이후 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동을 한 후 Qiaex gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 정제하였다.

84> <실시예 3> 키메라 항체의 경쇄 및 중쇄의 증폭

85> (3-1) 경쇄의 증폭

- 86> 경쇄(light chain)를 증폭하기 위한 PCR을 수행하기 위하여, 각각 100ng의 상기 실시예 (2-1)에서 제조 및 정제된 $V_L(V_{\kappa}, V_{\lambda})$ PCR 산물과 상기 실시예 (2-2)에서 제조 및 정제된 C_{κ} PCR 산물, 각각 60pmol의 서열번호 18 및 서열번호 15로 표시되는 프라이머, 10 μ l 10 \times PCR buffer, 8 μ l 2.5mM dNTP mixture, 0.5 μ l Taq polymerase를 혼합하고 증류수를 100 μ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 120초의 반응을 20회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 정지하였다.
- 87> 이후 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동을 한 후 Qiaex gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 정제하였다.
- 88> (3-2) 중쇄의 증폭
- 89> 중쇄(heavy chain) Fd 영역(V_H 및 C_{H1})을 증폭하기 위한 오버랩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 수행하기 위해서, 각각 100ng의 상기 실시예 (2-1)에서 제조 및 정제된 V_H PCR 산물과 상기 실시예 (2-2)에서 제조 및 정제된 C_{H1} PCR 산물, 각각 60pmol의 서열번호 19 및 서열번호 17로 표시되는 프라이머, 10 μ l 10 \times PCR buffer, 8 μ l 2.5 mM dNTP mixture, 0.5 μ l Taq polymerase를 혼합하고, 증류수를 100 μ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 120초의 반응을 20회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 정지하였다.
- 90> 이후 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동을 한 후 Qiaex gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 정제하였다.

91> <실시예 4> 키메릭 Fab 라이브러리의 제조

- 92> 키메릭 토끼/인간 Fab 유전자를 만들기 위한 PCR을 수행하기 위하여, 각각 100ng의 상기 실시예 (3-1)에서 정제된 키메릭 경쇄 유전자 산물과 상기 실시예 (3-2)에서 정제된 키메릭 중쇄 유전자 산물, 각각 60pmol의 서열번호 18 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머, 10 μ l 10 \times PCR buffer, 8 μ l 2.5mM dNTP mixture, 0.75 μ l Taq polymerase를 혼합하고 증류수를 100 μ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 180초의 반응을 20회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하였다.
- 93> 이후 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동을 한 후 Qiaex gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 정제하였다.
- 94> 이상과 같은 방법으로 토끼 V_L 및 V_H 서열을 인간 C_K 및 C_{H1} 서열과 결합시킨 후, 항체 절편의 라이브러리를 코딩하는 최종 PCR 절편들을 제한효소 SfiI로 절단하고, 순수 분리한 다음 도 2에 도시되어 있는 파지미드 벡터 pComb3X(the Scripps Research Institute, CA, USA)에 삽입하였다. 제조된 파지미드 DNA로 *E. Coli* ER2537(NEB)을 eletroporation을 통하여 형질전환시켰다. 이렇게 도입된 파지는 파지 코트 단백질(phage coat protein)인 pIII에 융합단백질 형태로서 Fab를 표면발현(display)하고, 그 유전자는 파지 내부에 가지고 있는 파지 입자(phage particle; 한 단위로서의 유전자 및 폴리펩티드)를 형성하게 된다.

95> <실시예 5> 항 HGF Fab를 포함하는 파지 클론의 선별

- 96> 96-웰 플레이트(costar No. 3690)에 각 웰당 25 μ l의 TBS 용액에 10 μ g/ml의 HGF를 코팅하고, 실시예 4에서 제조한 Fab를 표면발현하고 있는 파지를 가한 후 2시간정도 실온에서 정치하

였다. 이후 PBS내 0.5%(v/v) 트윈 20으로 세척한 후, 0.1M HCl-글리신(pH 2.2)으로 용출하였다. 세척 회수는 첫 패닝(panning)에 5회, 두 번째 패닝에 10회, 세 번째 패닝에 15회로 증가시켰다. 전형적으로 7회의 패닝을 수행하였다. 패닝이 진행됨에 따라 HGF에 특이적으로 결합하는 Fab를 표면발현하는 파지의 분획이 늘어, HGF가 도포된 ELISA 플레이트와 HRP-conjugated anti-M13 phage antibody(Pharmacia)를 이용한 효소 면역 측정에서 HGF가 코팅된 플레이트에 결합하여 나타나는 효소면역 측정에서의 흡광도가 점점 증가하는 것을 볼 수 있다(도 3 참조). 마지막 회의 패닝 후에, HGF로 코팅된 ELISA 플레이트 및 항-인간 염소 Fab 다클론 항체(Pierce)를 사용한 EIA를 통해 항 HGF Fab를 포함하는 파지 클론을 선별하였다. 선별된 파지 클론을 H61(클론 61) 및 H68(클론 68)로 명명하였다. 상기 H61 및 H68 클론은 HGF에 대하여 특이적으로 기준치 이상의 강한 신호를 나타내었고(도 7 참조), 이들에 대해 염기서열 분석을 수행하고, 결정된 염기서열로부터 아미노산 서열을 결정하였다.

<97> <실시예 6> 선별된 파지의 서열 분석

<98> 구체적으로, 염기서열 분석은 서열번호 21 및 서열번호 22의 2가지 시퀀싱 프라이머를 이용한 염료표지 프라이머 시퀀싱 방법(dye labeled primer sequencing method)(Chung et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2002;128:641-649)으로 수행하였다. 그 결과, 상기 H61 클론은 각각 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 염기서열을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 갖는다는 것을 확인하였고, H68 클론은 각각 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 염기서열을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 갖는다는 것을 확인하였다.

99> 이로부터 상기 H61 및 H68 클론의 V_H 및 V_L 영역에 대한 아미노산 서열을 유추해본 결과, H61 클론은 각각 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역 및 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 가지고, H68 클론은 각각 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역 및 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 갖는다는 것을 확인하였다.

100> 상기 H61 및 H68 클론의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역(framework region; FR)과 항원결합부위(complementarity determining region; CDR)를 해리스 등의 문헌(Harris et al., Protein Science, Volume 4(2), p306-10, 1995)을 참고하여 분석해 본 결과, H61 및 H68 클론은 아래 표 2와 같은 영역 구성을 가짐을 알 수 있었다.

101> 【표 2】

영역	H61 클론 V_H	H61 클론 V_L	H68 클론 V_H	H68 클론 V_L
FR1	1-30	1-23	1-30	1-23
CDR1	31-35	24-34	31-35	24-34
FR2	36-49	35-49	36-49	35-49
CDR2	50-66	50-56	50-66	50-56
FR3	67-98	57-88	67-98	57-88
CDR3	99-105	89-97	99-105	89-97
FR4	106-116	98-109	106-116	98-109

102> <실시예 7> 항-HGF Fab 발현 및 시험관내 분석을 위한 정제

- 03> 상기 실시예 5에서 선별된 클론의 파지미드 DNA로 비억제성 대장균 HB2151을 형질전환시켰다. 600nm에서의 흡광도가 0.5 내지 1이 될 때까지 클론을 배양하고, IPTG(1mM)을 첨가하여 20-24시간 동안 발현을 유도하였다. 배양 상등액을 Labscale TFF system(Millipore)으로 농축하였다. 항-HA 표지 마우스 단일클론항체를 이용한 친화 크로마토그래피로 농축된 Fab를 정제하였다. 정제된 Fab 절편에 대해 쿠마시 염색 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- 04> 먼저, 정제된 클론 68 항체 Fab 1-3 μ g정도를 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel(Invitrogen)에 로딩하여 전기영동을 시행하였다. 쿠마시 겔 염색 용액(Invitrogen)에 겔을 넣고, 30분 정도 교반한 후, 쿠마시 겔 탈염색 용액에 겔을 넣고, 단백질이 보일 정도까지 교반하였다. 쿠마시 염색 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이, 비환원된 클론 68 항체의 경우(레인 2)는 분자량 50,000 Da 근처에서 대부분의 Fab 항체를 관찰할 수 있었고, 환원된 클론 68 항체의 경우(레인 3)는 Fab 항체가 경쇄 및 중쇄 Fd 영역으로 분리되어 분자량 25,000 Da 정도에서 관찰할 수 있었으며, 이러한 항체이외의 다른 단백질 밴드는 거의 관찰되지 않았다. 이는 클론 68 항체 Fab의 경쇄와 중쇄가 각각 25,000 Da 정도의 크기를 가지고, 상기 경쇄와 중쇄가 이황화 결합에 의해 연결된 Fab가 50,000 Da 정도의 크기를 갖는다는 사실에 비추어, 만족할만한 순도(purity)로 클론 68 항체 Fab가 분리, 정제되었음을 나타내는 것이다. 다만, 레인 2에서 25,000 Da 부근에 약한 밴드가 나타나는 것은 서로 결합하지 못한 Fab의 경쇄 및 중쇄 Fd 영역에 기인한 것으로 보인다.
- 105> 한편, 웨스턴 블롯팅을 시행하기 위해, 정제된 Fab 1-3 μ g정도를 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel(Invitrogen)에 로딩하여 전기영동을 시행하였다. 분자량에 따라 분리된 Fab를 BioTrace Nitrocellulose membrane(PALL)에 고정화시켰다. 5% non-fat dry milk/TBS로 30분간 블로킹하였다. 양고추냉이 퍼옥시다아제가 결합된 항-인간 염소 Fab 다클론 항체(Pierce)를

1000배로 희석한 3% non-fat dry milk/TBS에 상기 멤브레인을 1시간 동안 교반하였다. TBS로 멤브레인을 30분간 세척해 주고, Supersignal West Pico stable peroxide solution(Pierce)과 Supersignal West Pico Luminol/Enhancer solution(Pierce)을 동량 혼합하여 멤브레인에 고루 적신 후, 암실에서 X-ray 필름(Kodak)에 감광시켰다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

.06> 도 5에서 제일 좌측에 있는 레인이 마커이고, 나머지 레인들은 모두 정제된 Fab를 로딩한 레인이다. 도 5에서 보는 바와 같이, 분자량 50,000 Da 정도에서 다량의 Fab가 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 아울러 서로 결합하지 못한 경쇄와 중쇄 Fd 영역이 분자량 25,000 Da 근처에서 나타남을 확인할 수 있었다.

.07> <실시예 8> HGF의 중화가능 에피토프의 서열 및 특성 분석

.08> (8-1) 서열 분석

.09> 96-웰 플레이트(costar No. 3690)에 각 웰당 25 μ l의 TBS 용액에 10 μ g/ml의 항 HGF 클론 61 혹은 항 HGF 클론 68 Fab를 코팅하고, PHD peptide libraryTM(phage display of combinatorial peptide library)(New England Biolob)를 가한 후 2시간정도 실온에서 정치하였다. 이후 PBS내 0.5%(v/v) 트윈 20으로 세척한 후, 0.1M HCl-글리신(pH 2.2)으로 용출하였다. 세척 회수는 첫 패닝(panning)에 5회, 두 번째 패닝에 10회, 세 번째 패닝에 15회로 증가시켰다. 전형적으로 7회의 패닝을 수행하였다. 마지막 회의 패닝 후에, 항 HGF 클론 61 혹은 클론 68 Fab로 코팅된 ELISA 플레이트 및 양고추냉이 퍼옥시다제-결합된 항-M13 파지 염소 단일 클론 항체(Roche)를 사용한 EIA를 통해, 항 HGF 클론 61 혹은 클론 68 Fab에 결합하는 파지 클

론을 선별하였다. 선별된 이들에 대해 염기서열분석을 수행하고, 결정된 염기서열로부터 아미노산 서열을 결정하였다.

- 10> 구체적으로, 염기서열 분석은 서열번호 31의 시퀀싱 프라이머를 이용한 염료표지 프라이머 시퀀싱 방법(Chung et al., supra)으로 수행하였고, 분석된 염기서열로부터 유추해 낸 펩타이드의 아미노산 서열을 서열번호 32 및 서열번호 33에 나타내었다.
- 11> 이후, 96-웰 플레이트(costar No. 3690)에 각 웰당 25 μ l의 TBS 용액에 10 μ g/ml의 c-MET를 코팅하고, 위에서 결정한 서열번호 32와 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 함유한 클론을 가하였다. 이후 PBS내 0.5%(v/v) 트윈 20으로 세척한 후, 양고추냉이 퍼옥시다제-결합된 항-M13 파지 염소 단일클론 항체(Roche)를 가하였다.
- 112> 도 6에서 보는 바와 같이, 서열번호 32 및 서열번호 33의 펩타이드를 함유하는 파지(1, 2)는 c-MET에 결합하는데 반하여, 서열번호 32 및 33의 펩타이드를 함유하지 않는 2개의 대조군 파지(3, 4)는 c-MET에 결합하지 않았다. 이로부터, 항 HGF 항체 클론 68의 항원 결합부위는 c-MET의 HGF 결합부위를 모방(mimicking)하고 있고, 클론 68에 결합하는 서열번호 32 및 서열번호 33의 펩타이드는 HGF의 c-MET 결합부위를 모방하여 HGF의 중화가능 에피토프로 작용할 수 있음을 알 수 있다.

113> (8-2) 특성 분석

- 114> 한편, 항 HGF 항체의 항원결합 부위의 성격을 파악하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 시행하였다. HGF 1-3 μ g정도를 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel(Invitrogen)에 로딩하여 전기영동을 시행하였다. 이때 일부는 환원제를 투여하여 전처리 후 겔에 로딩하였으며, 일부는 환원제를

투여하지 않고 겔에 로딩하였다. 이후 분자량에 따라 분리된 단백질을 BioTrace Nitrocellulose membrane(PALL)에 고정화시켰다. 5% non-fat dry milk/TBS로 30분간 블로킹하였다. 항 HGF 항체 클론 61과 클론 68을 각각 가하고 상기 멤브레인을 1시간 동안 교반하였다. 이후 양고추냉이 퍼옥시다아제가 결합된 항-인간 염소 Fab 다클론 항체(Pierce)를 1000배로 희석한 3% non-fat dry milk/TBS에 상기 멤브레인을 1시간 동안 교반하였다. TBS로 멤브레인을 30분간 세척해 주고, Supersignal West Pico stable peroxide solution(Pierce)과 Supersignal West Pico Luminol/Enhancer solution(Pierce)을 동량 혼합하여 멤브레인에 고루 적신 후, 암실에서 X-ray 필름(Kodak)에 감광시켰다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

- 15> 도 8에서 화살표로 분자량 마커를 표시하였다, A의 경우 클론 61을, B의 경우는 클론 68을 사용하였다. 레인 1은 환원되지 않은 HGF를, 레인 2는 환원된 HGF를 로딩하였다. 클론 61과 클론 68 모두 환원되지 않은 HGF에는 결합하지만 환원된 HGF에는 결합하지 못하는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과는 클론 61 및 클론 68이 결합하는 항원결정부위의 3차원적인 구조가 항원 항체 반응에 결정적이며, 비선형(non-linear) 에피토프임을 시사하는 것이다.

116> <실시예 9> MDCK 비산(scattering) 분석

- 117> MDCK 세포(Madine Darby canine kidney cell; ATCC CCL 34)를 5% FCS가 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂ 존재하에 배양하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰당 2000개의 세포를 분주하고, 신선한 배지내에 2ng/ml(29 pM)의 HGF에 하룻밤동안 노출시켰다. 이때 항 HGF Fab와 항 human Fab 항체를 각기 다른 농도로 첨가하였다. 비산 효과는 광학 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9의 B는 세포의 비산 정도를 1등급부터 6등급

까지 나눈 기준을 보여주고 있다. HGF에 의한 비산효과의 억제 정도가 100%일 때 6등급, 100-90%일 때 5등급, 90-60%일 때 4등급, 60-30%일 때 3등급, 30-10%일 때 2등급, 10%이하일 때 1등급으로 정의하였다. A는 첨가한 항 HGF Fab와 항 human Fab 항체의 HGF 농도에 따라 비산 정도가 달라지는 것을 보여주는 그림이다.

- 18> 항 HGF Fab의 HGF에 대한 몰비(molar ratio)가 50배, 항 human Fab 항체의 HGF에 대한 몰비가 50 - 100배 정도 되었을 때 가장 높은 비산 억제 효과를 볼 수 있었다.

119> <실시예 10> BIAcore 분석

120> (10-1) HGF에 대한 항 HGF Fab의 친화성 분석

- 121> HGF에 대한 항 HGF Fab의 친화성은 BIAcore 3000(BIAcore AB, Uppsala, Sweden)을 사용하여 SPR(Surface plasmon Resonance; 표면 플라즈몬(특정 파장의 광이 금속에 조사되어 광에너지가 자유전자로 전이되는 공명현상 결과 발생하는 표면파, 시료 표면에서의 물질 조성 변화에 따라 공명 파장의 이동이 발생함) 공명 기술)로 결정하였다.

- 122> 대략적으로 HGF의 1069 공명단위(Resonance units; RU)가 아민 결합 방법(amine coupling method)을 통하여 CM5 센서칩(BIAcore AB)에 결합되었다. 결합 상호작용은 25℃에서 30 μ l/min의 속도로 0.005% 계면활성제 P20을 함유하는 PBS(phosphate buffered saline) 버퍼에서 수행하였다. 표면은 1M NaCl/50mM NaOH로 재생하였다. 운동속도상수(kon and koff)와 평형해리상수(Kd)가 결정되었다. 클론 68 항체의 HGF에 대한 결합친화성을 도 10에 나타내었다. 그 결과, 클론 68 항체의 주입량이 증가함에 따라 CM5 칩에 고정되어있는 HGF에 결합하는 클론 68 항체의 양이 증가하는 것을 알 수 있다.

23> (10-2) 클론 68 항체의 c-Met에 대한 HGF의 결합억제능 분석

24> 한편, 클론 68 항체가 c-Met에 대한 HGF의 결합을 억제하는 것을 실시간으로 증명하기 위하여, c-Met을 아민 결합 방법을 통해 CM5 센서칩에 결합시켰다. 이후 HGF를 50nM의 농도로 단독으로 주입하고 5개의 다른 농도를 갖는(50nM, 250nM, 500nM, 1 μ M, 1.5 μ M) 클론 68 항체와 5개의 다른 농도를 갖는(50nM, 100nM, 200nM, 400nM, 600nM) 수용성 c-Met과 사전혼합하였다. 결합 상호작용은 25℃에서 30 μ l/min의 속도로 0.005% 계면활성제 P20을 함유하는 PBS 버퍼에서 수행하였다. 표면은 1M NaCl/50mM NaOH로 재생하였다.

25> 클론 68 항체의 c-Met에 대한 HGF의 결합억제 정도를 도 11에 나타내었다. 그 결과, 50nM HGF를 주입하였을 때는 455.5 RU로 c-Met에 결합했던 것에 비해(I), 50nM HGF에 클론 68 항체를 농도를 달리하여 혼합하여 주입하였을 때는, 즉, 클론 68 항체를 각각 50nM(II), 250nM(III), 500nM(IV), 1 μ M(V) 및 1.5 μ M(VI)으로 주입하였을 때는, 각각 406.5, 328, 260, 111.1 및 71의 RU값으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 클론 68 항체의 농도를 증가시킴에 따라, HGF가 c-MET에 결합하는 양이 감소한다는 것을 알 수 있다. 클론 68 항체만을 주입했을 경우에는 binding이 없었다.

126> (10-3) 수용성 c-Met에 의한 HGF의 c-Met 결합억제정도 분석

127> 또한, HGF의 c-Met에 대한 결합을 수용성 c-Met으로 억제하는 실험을 수행하였다. c-Met을 아민 결합 방법을 통해 CM5 센서칩에 2979 RU를 고정하였다. 결합 상호작용은 25℃에

서 $30\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 0.005% 계면활성제 P20을 함유하는 PBS 버퍼에서 수행하였다. 표면은 1M NaCl/50mM NaOH로 재생하였다.

128> 그 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에서 보는 바와 같이, 50nM의 HGF를 주입하였을 때는 455.5 RU로 c-Met에 결합했던 것에 비해(I), 50nM HGF에 수용성 c-Met을 농도를 달리하여 혼합하여 주입하였을 때는, 즉, 수용성 c-Met를 각각 50nM(II), 100nM(III), 200nM(IV), 400nM(V) 및 600nM(VI)으로 주입하였을 때는, 각각 310.3, 225.7, 167.4, 93.7 및 70.9의 RU 값으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 수용성 c-MET의 농도를 증가시킴에 따라, HGF가 칩에 고착화한 c-Met에 결합하는 양이 점점 감소한다는 것을 알 수 있다.

【발명의 효과】

129> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 HGF의 중화가능 에피토프에 결합하는 중화 항체는 단일제제로서 HGF를 중화시킬 수 있으므로, 보다 효과적으로 HGF와 그 수용체인 Met의 결합에 의해 야기되는 여러 가지 질환, 특히, 암의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 32 또는 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 HGF(hepatocyte growth factor; 간세포성장인자)의 중화가능 에피토프.

【청구항 2】

제 1 항의 중화가능 에피토프를 암호화하는 DNA.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서,

서열번호 34 또는 서열번호 35로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 DNA.

【청구항 4】

제 1 항의 중화가능 에피토프에 결합하는 중화 항체.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

상기 항체는 키메릭 항체, 모노클로날 항체 또는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

【청구항 6】

제 4 항에 있어서,

상기 중화 항체는 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역과 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 갖는 것을 특징으로 하는 항체.

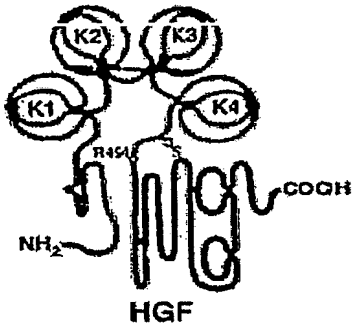
【청구항 7】

제 4 항에 있어서,

상기 중화 항체는 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_H 영역과 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 V_L 영역을 갖는 것을 특징으로 하는 항체.

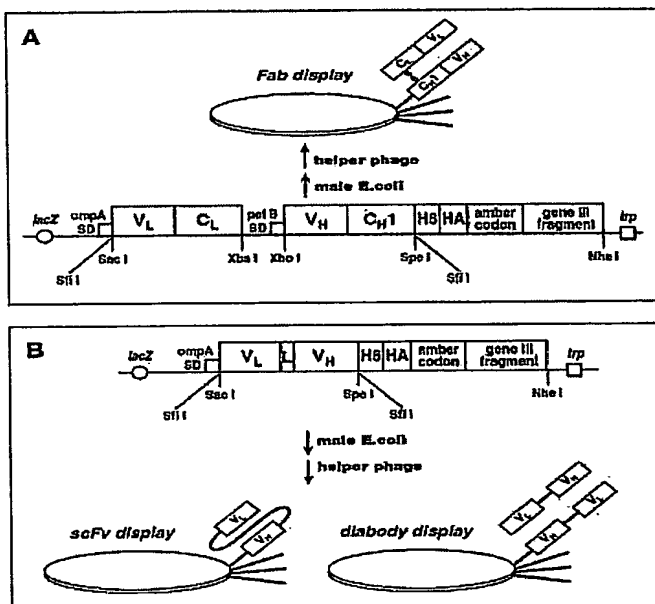
【도면】

【도 1】

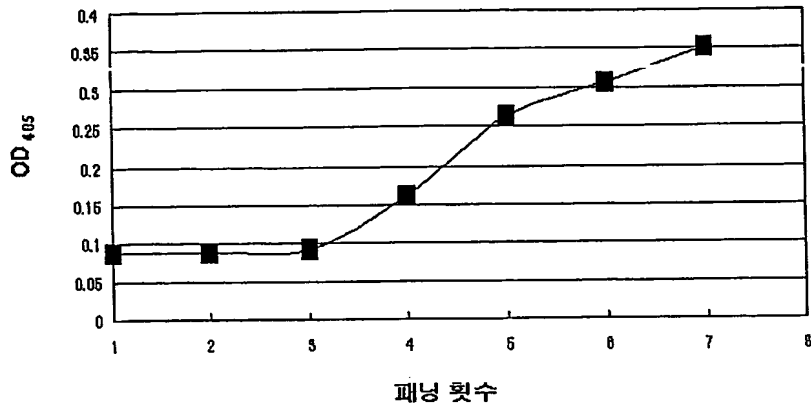


【도 2】

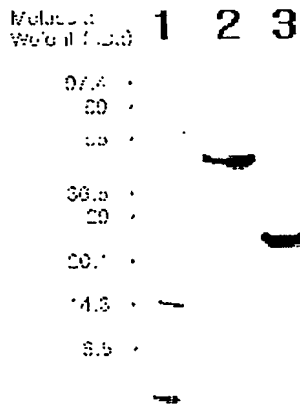
pComb3X



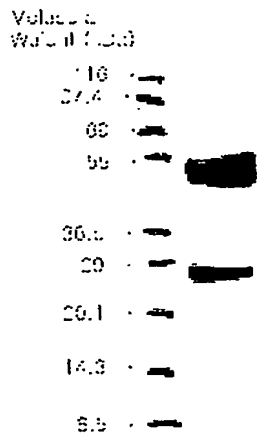
【도 3】



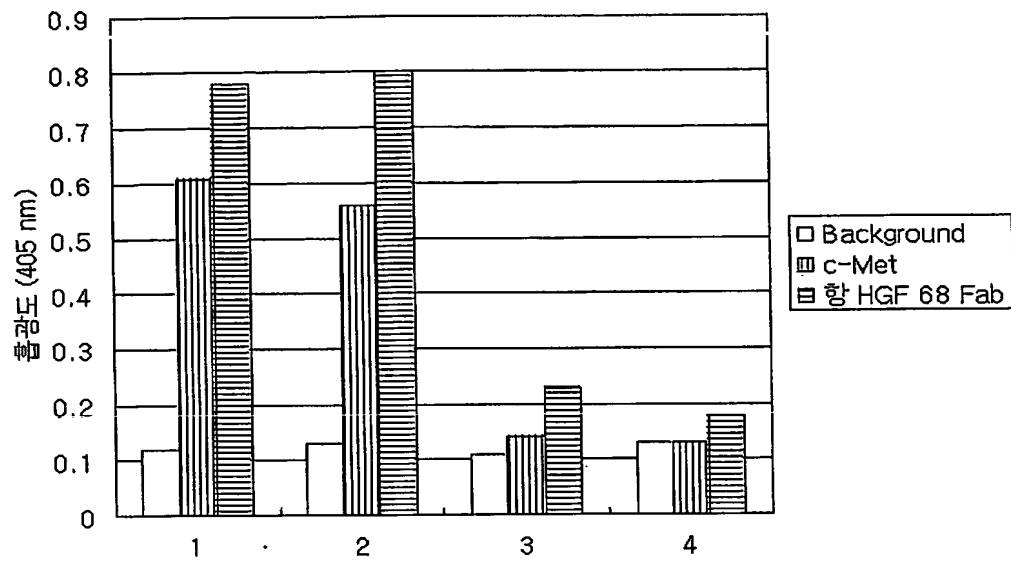
【도 4】



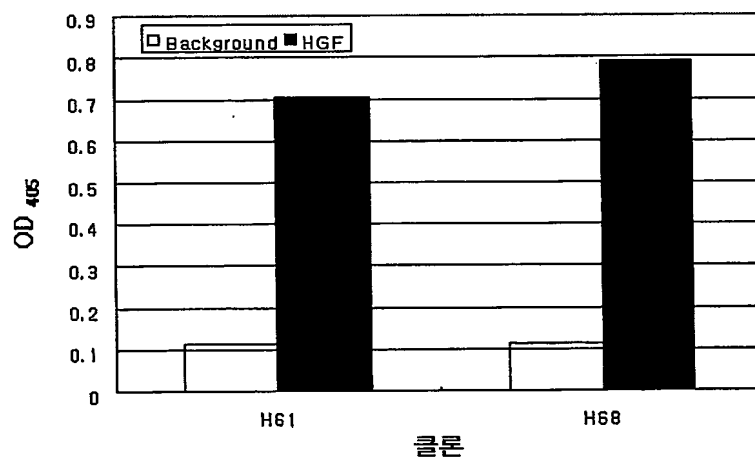
【도 5】



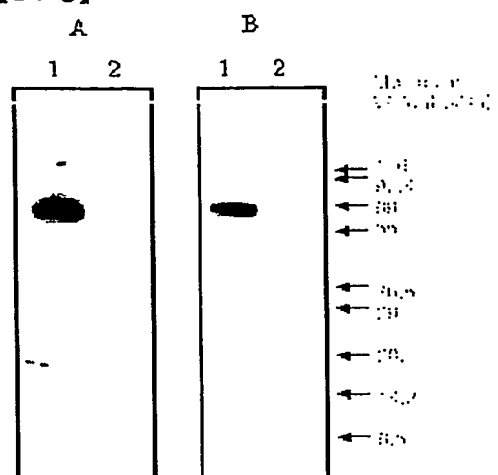
【도 6】



【도 7】

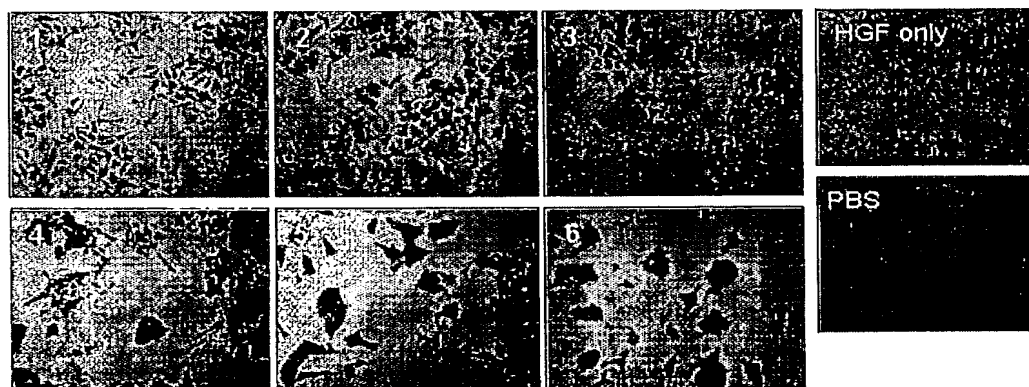


【도 8】

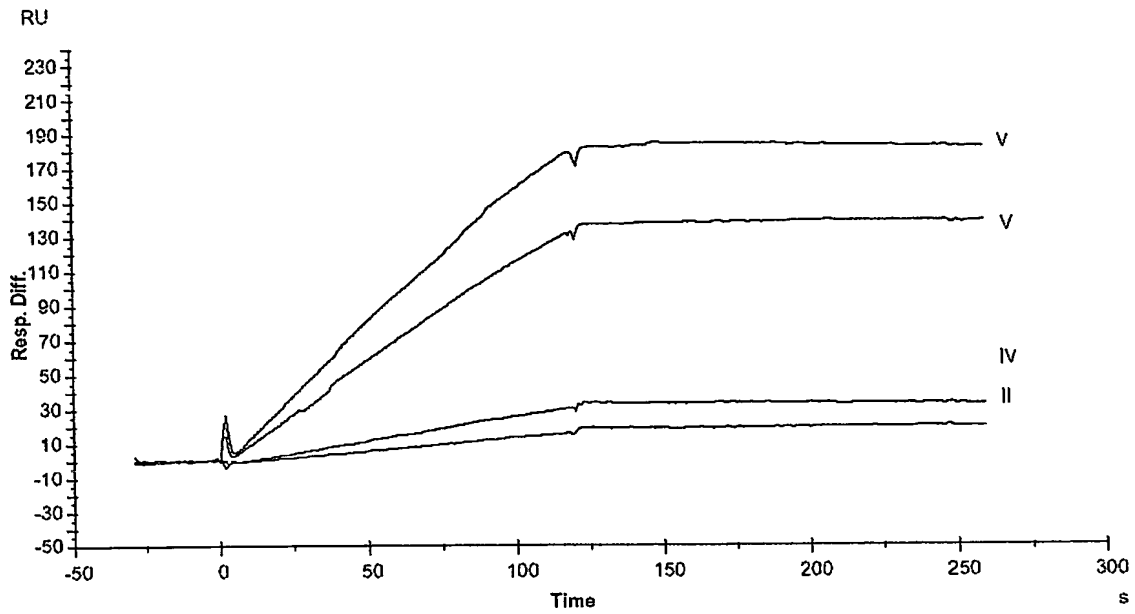


【도 9】

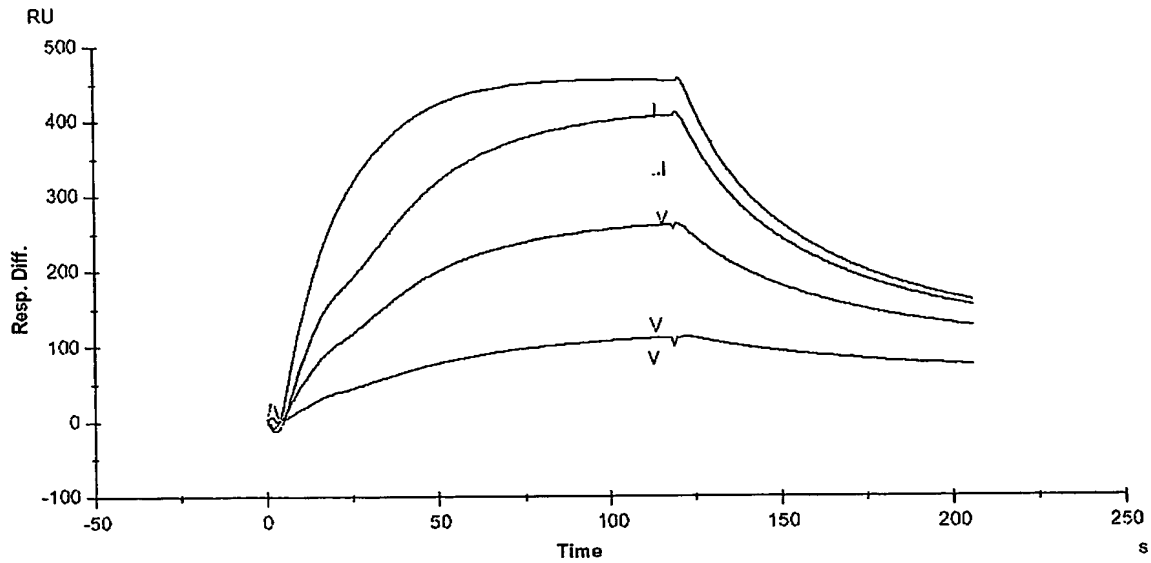
Fab* mAb*		500	250	100	50	25	10
A	10	3	4	5	4	4	3
	25	3	4	5	5	5	4
	50	4	5	6	6	5	3
	100	5	6	6	4	4	3
	250	6	6	4	3	3	3
	500	6	5	3	3	3	3
	1000	5	3	3	3	3	3

B

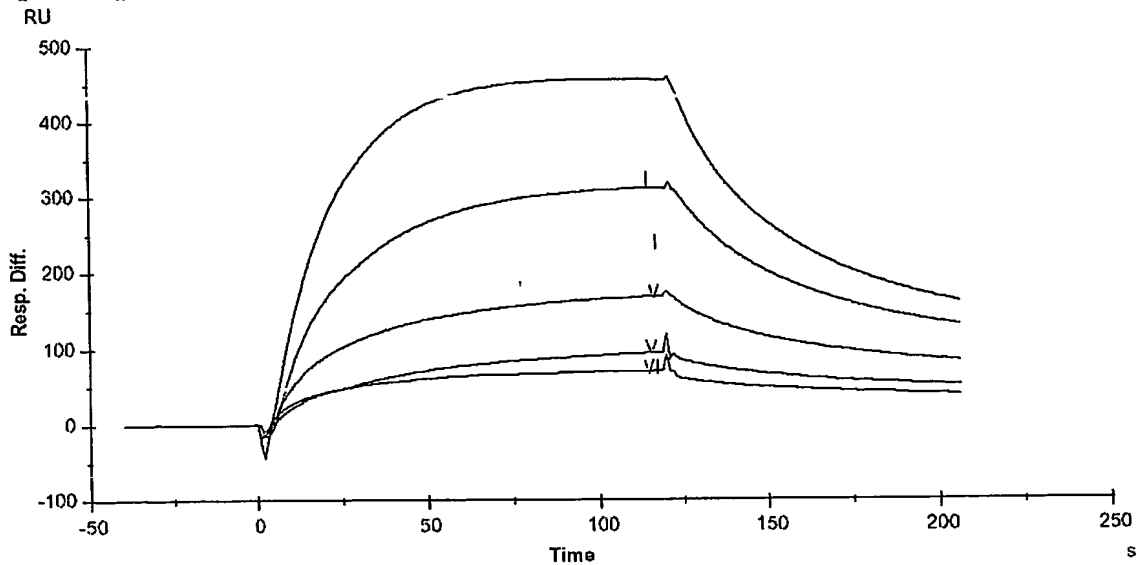
【도 10】



【도 11】



【도 12】



【서열목록】

<110> National Cancer Center <120> Neutralizable epitope of HGF and
neutralizing antibody binding to same <130> FPD200307-0065 <160> 35 <
170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> Vkappa5' sense primer RSCVK1 <400> 1 ggcccaggc ggccgagctc
gtgmtgaccc agactcca 38 <210> 2 <211> 38 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Vkappa5' sense primer RSCVK2 <400>
2 ggcccaggc ggccgagctc gatmtgaccc agactcca 38 <210>
3 <211> 38 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Vkappa5'
sense primer RSCVK3 <400> 3 ggcccaggc ggccgagctc gtgatgaccc agactgaa
38 <210> 4 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Vkappa3' reverse primer RHybK1-B <400> 4 agatggtgca gccacagttc gtttgatttc
cacattggtg cc 42 <210> 5 <211> 42 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> Vkappa3' reverse primer RHybK2-B <400> 5
agatggtgca gccacagttc gtaggatctc cagctcggtc cc 42 <210>

6 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Vkappa3'
reverse primer RHybK3-B <400> 6 agatggtgca gccacagttc gtttgacsac cacctcggtc cc
42 <210> 7 <211> 40 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Vlambda5' sense primer RSClambdal <400> 7 gggcccaggc ggccgagctc gtgctgactc
agtcgcctc 40 <210> 8 <211> 45 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> Vlambda3' reverse primer RHybL-B <400> 8
agatggtgca gccacagttc ggcctgtgac ggtcagctgg gtccc 45 <210>

9 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> VH5' sense
primer RHybVH1 <400> 9 gctgcccac cagccatggc ccagtcggtg gaggagtccr gg
42 <210> 10 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

VH5' sense primer RHybVH2 <400> 10 gctgcccac cagccatggc ccagtcggtg aaggagtccg ag
42 <210> 11 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

VH5' sense primer RHybVH3 <400> 11 gctgcccac cagccatggc ccagtcgytg gaggagtccg gg
42 <210> 12 <211> 44 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

VH5' sense primer RHybVH4 <400> 12 gctgcccac cagccatggc ccagsagcag ctgrtgagggt ccgg
44 <210> 13 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

VH3' reverse primer RHybIgGCH1-B <400> 13 cgatgggccc ttggtggagg ctgargagay

ggtgaccagg gtgcc 45 <210> 14 <211> 24 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence <220> <223> Sense primer HKC-F for amplification of
 the human Ckappa region and the pelB leader sequence from a cloned human Fab
 <400> 14 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc
 24 <210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Reverse primer Lead-B for amplification of the human Ckappa region and the
 pelB leader sequence from a cloned human Fab <400> 15 ggccatggct ggttgggcag c
 21 <210> 16 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Sense primer HIgGCH1-F for amplification of the human CH1 Chain from a cloned
 human Fab <400> 16 gcctccacca agggcccatc ggtc
 24 <210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Reverse primer dpseq for amplification of the human CH1 Chain from a cloned
 human Fab <400> 17 agaagcgtag tccggaacgt c
 21 <210> 18 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Sense primer RSC-F for PCR assembly of rabbit VL sequences with the human
 Ckappa PCR Product <400> 18 gaggaggagg aggaggaggc gggggcccagg cggccgagct c
 41 <210> 19 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Sense primer LeadVH for PCR assembly of rabbit VH sequences with the human
 CH1 PCR product <400> 19 gctgccaac cagccatggc c
 21 <210> 20 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 Reverse primer dp-EX for PCR assembly of chimeric light-chain sequences with

chimeric heavy-chain (Fd) sequences <400> 20 gaggaggagg aggaggagag aagcgtagtc
 cggaacgtc 39 <210> 21 <211> 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence <220> <223> sequencing primer <400> 21 agaaacacaa
 agtctacgcc 20 <210> 22 <211>
 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sequencing primer <400>
 22 gttgggcagc gagtaataac 20 <210>
 23 <211> 348 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 nucleotide sequence encoding VH region of clone 61 <400> 23 caggagcagc tgatggagtc
 cgggggtcgc ctggtcaatc ctggcgaatc cctgacactc 60 acctgcaaag cctctggatt
 caccttcagt agctactaca tgagctgggt ccgccaggct 120 ccagggaagg ggctggagtg
 gatcggatac attggtacta gtagtggtac cacttactac 180 gcgaactctg tgaagggccg
 attcaccatc tccagcgaca acgcccagaa taccgtatctt 240 ctgcgaatga ccagtctcac
 agactcggac acggccacct atttctgtgc aagagggctg 300 ggcagaatca acttgtgggg
 cccaggcacc ctggtcaccg tctcttca 348 <210> 24 <211> 327 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> nucleotide sequence encoding VL
 region of clone 61 <400> 24 gagctcgtgc tgaccagac tccatcctct atgtctgcag ctgtgggagg
 cacagtcacc 60 atcaattgcc aggccagtca gagtgttagc aactacttag cctggatatca
 gcagaaacca 120 gggcagcctc ccaagctcct gatctacagg gcatccactc tggcatctgg
 ggtcccatcg 180 cgtttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttactctca ccatcagtgg
 catgaaggct 240 gaagatgctg ccacttatta ctgtcaaagt gggtattata gtgctgggtgc
 gacttttggga 300 ggtggcacca atgtggaaat caaacga

327 <210> 25 <211> 348 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 nucleotide sequence encoding VH region of clone 68 <400> 25 cagcagcagc tggtaggagtc
 cgggggtcgc ctggtcaatc ctggcgaatc cctgacactc 60 acctgcaaag cctctggatt
 caccttcagt acctactaca tgagctgggt ccgccaggct 120 ccagggaagg ggctagagt
 gatcggatac attggtacta gtagtggtag cacttactac 180 gcgaactctg tgaagggccg
 attcaccatc tccagcgaca acgcccagaa taccgtatctt 240 ctgcaaataa ccagtctgac
 agactcggac acggccacct atttctgtgc aagagggtctg 300 ggcagaatta acttgtgggg
 cccaggcacc ctggtcaccg tctcctca 348 <210> 26 <211> 327 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> nucleotide sequence encoding VL
 region of clone 68 <400> 26 gagctcgatc tgaccagac tccatcctct gtgtctgcag ctgtgggagg
 cacagtcacc 60 atcaattgcc aggccagtca gtagttagc aacctcttag cctggtatca
 gcagaaacca 120 gggcagcctc ccaagctcct gatttatggt gcatccaatc tggaatctgg
 ggtcccatcg 180 cgtttccgtg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagtgg
 catgaaggct 240 gaagatgctg ccacttatta ctgtcaaagt gggtattata gtgctggtag
 gacttttggg 300 gctggcacca atgtggaaat caaacga

327 <210> 27 <211> 116 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 amino acid sequence of VH region of clone 61 <400> 27 Gln Glu Gln Leu Met Glu Ser
 Gly Gly Arg Leu Val Asn Pro Gly Glu 1 5 10
 15 Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20
 25 30 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 Ile 35 40 45 Gly Tyr Ile Gly Thr Ser Ser

Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Phe 65
 70 75 80 Leu Arg Met Thr Ser Leu Thr Asp Ser Asp
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Gly Arg Ile Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val 100
 105 110 Thr Val Ser Ser 115 <210> 28 <211> 109 <
 212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> amino acid sequence of VL
 region of clone 61 <400> 28 Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Met Ser Ala
 Ala Val Gly 1 5 10 15 Gly Thr Val
 Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr 20
 25 30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 Ile 35 40 45 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Met Lys Ala 65
 70 75 80 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
 Gly Tyr Tyr Ser Ala Gly 85 90 95
 Ala Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys Arg 100
 105 <210> 29 <211> 116 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> amino acid sequence of VH region of clone 68 <400> 29 Gln
 Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Asn Pro Gly Glu 1 5
 10 15 Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr

Tyr 20 25 30 Tyr Met Ser Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40
 45 Gly Tyr Ile Gly Thr Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val 50
 55 60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val
 Phe 65 70 75 80 Leu Gln Met Thr
 Ser Leu Thr Asp Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys 85
 90 95 Ala Arg Gly Leu Gly Arg Ile Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 Val 100 105 110 Thr Val Ser Ser
 115 <210> 30 <211> 109 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <
 223> amino acid sequence of VL region of clone 68 <400> 30 Glu Leu Asp Leu Thr
 Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly 1 5 10
 15 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Leu 20
 25 30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 Ile 35 40 45 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Met Lys Ala 65
 70 75 80 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
 Gly Tyr Tyr Ser Ala Gly 85 90 95
 Ala Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys Arg 100
 105 <210> 31 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence
 <220> <223> sequencing primer <400> 31 ccctcatagt tagcgtaacg

43-43

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.